

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-192695

(43)Date of publication of application : 09.07.2003

(51)Int.CI. C07K 5/062
A23J 3/34
A23L 1/305
A61K 38/00
A61K 38/55
A61P 43/00
C07K 5/083
C07K 5/087
C07K 5/097
C07K 7/14
C12N 9/99
C12P 21/06

(21)Application number : 2001-396622

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF
ADVANCED INDUSTRIAL &
TECHNOLOGY
OKINAWA SHOKURYO KK

(22)Date of filing : 27.12.2001

(72)Inventor : MARUYAMA SUSUMU
TOYA RYOICHI

(54) ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME INHIBITOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new angiotensin I converting enzyme inhibitor.

SOLUTION: The inhibitor contains peptides having a 2-8 amino acid sequence or its salts as an active ingredient. The inhibitor comprises a rice protein hydrolyzate that is produced via the following steps (1), (2) and (3). (1) Rice grains are heated to convert the rice starch to the α form; (2) The α -form rice grains are treated with amylase to prepare rice grain hydrolyzate, and (3) The rice starch hydrolyzate is treated with protease to produce rice protein hydrolyzate. The hydrolyzate or its ultrafiltrate is used as an active ingredient.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.10.2004

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-192695
(P2003-192695A)

(43)公開日 平成15年7月9日(2003.7.9)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト ⁸ (参考)
C 0 7 K 5/062	Z N A	C 0 7 K 5/062	Z N A 4 B 0 1 8
A 2 3 J 3/34		A 2 3 J 3/34	4 B 0 6 4
A 2 3 L 1/305		A 2 3 L 1/305	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 H 0 4 5
38/55			1 1 6

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-396622(P2001-396622)

(22)出願日 平成13年12月27日(2001.12.27)

(71)出願人 301021533
独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関1-3-1
(71)出願人 399086986
沖縄食糧株式会社
沖縄県浦添市勢理客4丁目4番1号
(72)発明者 丸山 進
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法
人産業技術総合研究所つくばセンター内
(74)代理人 100090251
弁理士 森田 憲一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 新規のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供する。

【解決手段】 前記阻害剤は、アミノ酸の数が2~8個で構成されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩を有効成分として含有する。また、前記阻害剤は、

(1)米を加熱して米デンプンを α 化する工程；(2)前記工程で得られる α 化米をアミラーゼ処理して米デンプン加水分解液を得る工程；及び(3)前記工程で得られる米デンプン加水分解液をプロテアーゼ処理して米タンパク質加水分解液を得る工程を含む製造方法により得られる米タンパク質加水分解液、又はその限外濾過通過物を有効成分として含有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害剤。

【請求項2】 配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩。

【請求項3】 (1) 米を加熱して米デンプンを α 化する工程；

(2) 前記工程(1)で得られる α 化米をアミラーゼ処理して米デンプン加水分解液を得る工程；及び(3)前記工程(2)で得られる米デンプン加水分解液をプロテアーゼ処理して米タンパク質加水分解液を得る工程を含むことを特徴とする、米タンパク質加水分解液の製造方法。

【請求項4】 請求項3に記載の製造方法により得ることのできる、米タンパク質加水分解液。

【請求項5】 請求項4に記載の米タンパク質加水分解液を限外濾過膜を通過させることにより得ることのできる、限外濾過膜通過物。

【請求項6】 請求項5に記載の限外濾過通過物をゲル濾過カラムに負荷し、30%メタノール水溶液で溶出して得ることのできる分子量400～1000の画分又は分子量200～450の画分。

【請求項7】 (1) 請求項4に記載の米タンパク質加水分解液；

(2) 請求項5に記載の限外濾過通過物；又は(3)請求項6に記載の分子量400～1000の画分若しくは分子量200～450の画分を有効成分として含有することを特徴とする、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 高血圧症の発症には、レニンーアンジオテンシン系が深いかかわりを有していることが良く知られている。このレニンーアンジオテンシン系では、血管内皮細胞膜などに存在するアンジオテンシンⅠ変換酵素(EC3.4.15.1；以下ACEと称することがある)が重要な役割を果たしている。すなわち、肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲンが、腎臓で産生される酵素レニンで切断されることにより、アミノ酸配列：Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu(配列番号9)

からなるアンジオテンシンⅠが生成し、更に、このアンジオテンシンⅠが、ACEで切断されることにより、アミノ酸配列：

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe(配列番号10)

からなるアンジオテンシンⅡが生成する。このアンジオテンシンⅡは、血管平滑筋を収縮させて血圧を高め、更に副腎皮質に作用してアルドステロンの分泌を促進させるなどの作用を有する。一方、血漿中に存在する酵素カリクレインは、タンパク質キニーゲンを切断することにより、血管を拡張させ、降圧させるブラジキニンを產生する。このブラジキニンは、ACEの作用により分解され、不活性化される。このように、ACEは、一方で昇圧性ペプチドであるアンジオテンシンⅡを生じさせると共に、他方で降圧性ペプチドであるブラジキニンを分解することにより、血圧を上昇の方向に進める。従って、ACEの活性を抑制することによって、血圧上昇を抑制すること、あるいは、血圧を下げる事が可能である。

【0003】 ACE阻害物質としては、例えは、蛇毒より得られた数種のペプチドを始めとして、カブトプリル(D-3-メルカプト-2-メチルプロパノイル-レ-プロリン)などの合成化合物が多数知られており、カブトプリルなどは、高血圧治療薬として使われている。また、化学合成により得られた種々のジペプチドがACE阻害活性を有することが報告されている(The Journal of Biological Chemistry, Vol. 255, 401-407, 1980)。また、近年、種々の食品中から多数のACE阻害活性を有するペプチドが同定されており、その内、牛乳カゼイン、発酵乳、又はかつおぶし由来の各ペプチドを添加した食品が、それぞれ、特定保健用食品として実用化されている(例えは、特公昭60-23085号公報；特公昭61-51562号公報；特公昭61-51564号公報；Biopolymers, 43, 119, 1997；及びBiopolymers, 43, 129, 1997)。

【0004】 更に、米由来のペプチドからも、ACE阻害活性を有するペプチドが同定されている。例えは、米糠由来の米タンパク質(弱アルカリ性溶液による米糠の抽出物)を、胃の消化液中のプロテアーゼであるペプシンで消化して得られた加水分解物から、分離精製させて得られた特定のペプチドが、ACE阻害活性を有することが確認されている(村元学及び河村幸雄, 食品工業, 34, 18-26, 1991)。また、米糠をサモアーゼ(細菌由来のプロテアーゼ；大和化成製)で処理して得られた分解物から分離精製させて得られた特定のペプチド；酒粕の凍結乾燥体(水分5%、粗タンパク質78%、糖質15%、及びその他2%)をサモアーゼ処理して得られた分解物から分離精製させて得られた特定のペプチド；又は清酒をカチオン交換樹脂処理することにより得られたペプチド画分から、分離精製させて得られた特定のペプチドが、それぞれ、ACE阻害活性を有することも確認されている(齊藤義幸ら, 日本農芸化学会誌, 66巻, 1081-1087, 1992)。

【0005】更に、特開平7-149658号公報には、玄米を粉碎機にかけて得られる玄米粉碎物に、タンパク質分解酵素、脂肪分解酵素、繊維分解酵素、デンプン分解酵素、及びペクチン分解酵素、並びに水を同時に加え、得られた反応液を、更に、絞り機で絞ることにより得られる溶液、あるいは、前記玄米粉碎物に液化酵素及び水を加え、煮沸抽出した後、絞り機で絞って得られた抽出液に、タンパク質分解酵素、脂肪分解酵素、繊維分解酵素、デンプン分解酵素、及びペクチン分解酵素を同時に加え、得られた反応液を、更に、絞り機で絞ることにより得られる溶液が、ACE阻害活性を有することが確認されている。しかし、この公報には、 α 化精白米からACE阻害活性を有するペプチドが得られることは開示されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】これまで述べたように、アンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤は、既に多数報告されているが、天然物（特に食品）由来で、血管内への吸収性及び安定性がより高く、安価に生産可能なアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤は、医薬品としてのみならず、特定保健用食品の素材としても常に求められている。本発明者は、 α 化精白米のアミラーゼ処理を実施した後に、プロテアーゼ処理を実施して得られた米タンパク質加水分解液が、ACE阻害活性を有するだけでなく、飲み易さの点で非常に優れた米飲料であることを見出した。また、前記米タンパク質加水分解液を分離精製して得られた各ペプチドが、ACE阻害活性を有するだけでなく、血管内への吸収性及び／又は安定性の優れたペプチドであることも見出した。本発明は、このような知見に基づくものである。従って、本発明の課題は、米由来で、血管内への吸収性及び安定性がより高く、しかも、安価に生産可能な新規のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】前記課題は、本発明による。

アミノ酸配列：

Trp Ala Pro (配列番号1)

からなるペプチド、

アミノ酸配列：

Trp Gln Pro (配列番号2)

からなるペプチド、

アミノ酸配列：

Ile Phe Arg (配列番号3)

からなるペプチド、

アミノ酸配列：

Thr Tyr (配列番号4)

からなるペプチド、

アミノ酸配列：

Gly Tyr Pro Arg Thr Pro Arg Thr (配列番号5)

からなるペプチド、

アミノ酸配列：

Gln Tyr (配列番号6)

からなるペプチド、

アミノ酸配列：

Phe Asp Arg (配列番号7)

からなるペプチド、若しくは

アミノ酸配列：

Ala Phe Thr Pro Arg (配列番号8)

からなるペプチド、又はそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とする、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害剤により解決することができる。また、本発明は、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩に関する。

【0008】また、本発明は、（1）米を加熱して米デンプンを α 化する工程；（2）前記工程（1）で得られる α 化米をアミラーゼ処理して米デンプン加水分解液を得る工程；及び（3）前記工程（2）で得られる米デンプン加水分解液をプロテアーゼ処理して米タンパク質加水分解液を得る工程を含むことを特徴とする、米タンパク質加水分解液の製造方法に関する。また、本発明は、前記製造方法により得ることのできる、米タンパク質加水分解液に関する。また、本発明は、前記米タンパク質加水分解液を限外濾過膜を通過させることにより得ることのできる、限外濾過膜通過物に関する。また、本発明は、前記限外濾過通過物をゲル濾過カラムに負荷し、30%メタノール水溶液で溶出して得ることのできる分子量400～1000の画分又は分子量200～450の画分に関する。更に、本発明は、（1）前記米タンパク質加水分解液；（2）前記限外濾過通過物；又は（3）前記分子量400～1000の画分若しくは分子量200～450の画分を有効成分として含有することを特徴とする、アンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害剤に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明のアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害剤は、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなる8種類のペプチド又はその塩の少なくとも1つを、有効成分として含む。配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるこれらのペプチド又はその塩は、それ自体、新規の化合物である。

【0010】「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」の内、配列番号1、2、5、又は8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、プロリンを含むため、消化管内及び血管内での安定性が高い。プロリンの周辺はプロテアーゼによる加水分解を受けにくいためである。また、配列番号1～4、6、又は7で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、2残基又は3残基のアミノ酸からなるため、血管内への吸収性が高い。

【0011】本発明のACE阻害剤において有効成分として用いることのできる「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」においては、各ペプチドを構成するアミノ酸残基は、L-アミノ酸残基又はD-アミノ酸残基のいずれであることもできる。従って、前記の各ペプチドは、L-アミノ酸残基のみからなることもできるし、D-アミノ酸残基のみからなることもできるし、あるいは、L-アミノ酸残基及びD-アミノ酸残基のキメラ体であることもできる。ACE阻害活性が高い点で、また、米を材料として安価に調製することができる点で、L-アミノ酸残基のみからなることが好ましい。

【0012】本発明のACE阻害剤において有効成分として用いることのできる「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」は、特に限定されるものではないが、例えば、本発明の製造方法により得られる米タンパク質加水分解液から、適当な分画操作を実施することにより調製することもできるし、あるいは、それ自体公知のペプチド製造方法により調製することもできる。公知のペプチド製造方法としては、例えば、有機化学的な合成方法によりアミノ酸を段階的に導入する、通常のペプチド合成法、加水分解酵素の逆反応を利用したペプチド合成法、あるいは、遺伝子工学的手法などを挙げることができる。

【0013】本発明のACE阻害剤において有効成分として用いることのできる前記ペプチドの塩は、薬剤学的に許容することのできる塩である限り、特に限定されるものではないが、例えば、酸付加塩、塩基付加塩、又は金属錯体を挙げることができる。薬剤学的に許容することのできる酸付加塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸塩、硫酸、硝酸、又はリン酸等）との塩、あるいは、有機酸（例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、タンニン酸、シュウ酸、フマル酸、グルコン酸、アルギン酸、マレイン酸、安息香酸、アスコルビン酸、又はトリフルオロ酢酸等）との塩を挙げることができる。また、薬剤学的に許容することのできる塩基付加塩としては、例えば、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩又はカリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩又はマグネシウム塩等）、あるいは、アミン類（例えば、アンモニウム、エタノールアミン、トリエチルアミン、又はジクロヘキシルアミン等）との塩を挙げることができる。更に、薬剤学的に許容することのできる金属錯体としては、例えば、亜鉛、鉄、カルシウム、マグネシウム、又はアルミニウム等との錯体を挙げができる。

【0014】より具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。

きる。配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基又はグルタミン残基における側鎖のアミノ基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基又はアルギニン残基のグアニジル基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。

【0015】配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基又はアルギニン残基のグアニジル基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基又はグルタミン残基における側鎖のアミノ基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基又はアルギニン残基のグアニジル基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基又はアスパラギン酸残基のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの塩としては、N末端のアミノ基又はアルギニン残基のグアニジル基に関する酸付加塩、C末端のカルボキシル基に関する塩基付加塩、あるいは、金属錯体を挙げができる。

【0016】生体内で、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩に容易に変換することのできる誘導体、すなわち、プロドラッグも本発明のACE阻害剤の有効成分として使用することができる。適当なプロドラッグの選択及び製造に一般的に用いられる方法は、例えば、Design of Prodrugs, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985に記載されている。

【0017】本発明の製造方法は、（1）米を加熱して米デンプンを α 化する工程（以下、 α 化工程と称する）；（2）前記 α 化工程で得られる α 化米をアミラーゼ処理して米デンプン加水分解液を得る工程（以下、アミラーゼ処理工程と称する）；及び（3）前記アミラーゼ処理工程で得られる米デンプン加水分解液をプロテアーゼ処理して米タンパク質加水分解液を得る工程（以下、プロテアーゼ処理工程）を含む。なお、本発明の製造方法では、アミラーゼ処理工程の後にプロテアーゼ処理工程を実施し、プロテアーゼ処理の後にアミラーゼ処

理を実施することはない。また、アミラーゼ処理工程では、アミラーゼ以外の酵素を同時に実質的に使用することではなく、従って、アミラーゼ活性を示す微生物であっても、アミラーゼ以外の酵素活性を同時に実質的に示す微生物（例えば、コウジカビ）を使用することもない。同様に、プロテアーゼ処理工程において、プロテアーゼ以外の酵素を同時に実質的に用いることはなく、従って、プロテアーゼ活性を示す微生物であっても、プロテアーゼ以外の酵素活性を同時に実質的に示す微生物を使用することもない。

【0018】本発明の製造方法における α 化工程において、原料として用いる米の種類は、特に限定されるものではなく、例えば、ジャボニカ米、インデディカ米、もち米、又は酒造好適米などを挙げることができる。

【0019】また、 α 化工程に用いる米としては、玄米、又は全部若しくは一部精白した精白米のいずれもを使用することができ、全部又は一部精白した精白米を用いることが好ましく、全部精白した精白米を用いることがより好ましい。精白米は、玄米と比べて、表層部の纖維質や糠層の影響を受けることが少なく、従って、得られる米タンパク質加水分解液の喉越しや飲み易さが優れているからである。なお、本明細書において、「米」とは、もみがらを取り去ったイネの実を意味する。また、「玄米」とは、もみがらを取り去った状態のものを意味し、胚芽及び胚乳並びにそれを覆う果皮からなる。更に、「精白米」とは、前記玄米を精白することにより、胚芽及び果皮を全部又は一部除去したものを意味し、特に「全部精白した精白米」は、実質的に胚乳のみからなる。

【0020】また、 α 化工程に用いる米の状態、すなわち、加熱する前の米の状態も、特に限定されるものではなく、例えば、米粒の状態で、あるいは、米粒を破碎又は粉碎処理した破碎又は粉末状態で、 α 化工程に用いることができる。

【0021】 α 化工程における加熱処理の反応条件（例えば、反応温度又は反応時間）は、原料米の種類又は状態、あるいは、添加する水量などに応じて、適宜決定することができる。例えば、精米米粒を用いる場合には、対米重量比1.4～2倍の量の水を加え、87～99℃で20～34分間加熱することにより、米デンプンの α 化を実施することができる。米デンプンの α 化、すなわち、米に含まれるデンプンを糊化させてから、次のアミラーゼ処理工程を実施すると、アミラーゼ処理効率が向上する。

【0022】アミラーゼ処理工程で用いるアミラーゼ（デンプン分解酵素）は、 α 化工程で得られた α 化米を、次のプロテアーゼ処理工程において効率よくプロテアーゼ処理することができる程度に、液化することのできるアミラーゼである限り、特に限定されるものではなく、例えば、基質特異性の広いアミラーゼ、例えば、 α

アミラーゼが好ましい。前記 α -アミラーゼとしては、例えば、液化酵素6T【阪急バイオインダストリー（株）製】、コクゲンA【大和化成（株）製】、コクラーゼ【三共（株）製】、GODO B α A-T【合同酒精（株）製】、スピターゼ【ナガセ生化学工業（株）製】、BAN 240L【ノボノルディスクバイオインダストリー（株）製】、ターマミル120L タイプL【ノボノルディスクバイオインダストリー（株）製】、アミラーゼK【天野製薬（株）製】、又はアミラーゼRBII【天野製薬（株）製】などを挙げることができる。

【0023】液化酵素6Tは、枯草菌（Bacillus subtilis）由来の α -アミラーゼであり、以下の理化学的性質を示す。作用pHについては、至適pHは5.9であり、pH5.0～7.0でも充分効力を示す。pH安定性については、30℃で25時間の処理では、pH4.8～10.0で安定である。作用温度については、至適温度は70～80℃であり、実用的には90℃でも作用する。温度安定性については、pH6.0で15分間の処理では、80℃まで安定である。

【0024】アミラーゼ処理工程で用いるアミラーゼとしては、液化酵素6Tを用いると、次のプロテアーゼ処理工程におけるプロテアーゼ処理の効率が向上し、しかも、本発明の製造方法で得られる米タンパク質加水分解液を飲料として摂取した場合に、喉越しがさらさらして飲み易く、更には、加熱による変色が少ないため、外観的品質が良好であるという利点がある。

【0025】飲料として摂取した場合の「飲み易さ」は、例えば、以下の方法により評価することができる。すなわち、複数（例えば、3～20人）のパネラーに飲料として摂取させた後、各パネラー毎に、飲料としての「外観（液色）」、「香り」、「味」、「旨み」、及び「甘さ」の各観点から、複数段階（例えば、7段階）の評点を記録してもらう。各パネラーの「総評」（すなわち、各パネラーの各観点における各評点を合計した総評点）を、パネラー全員に関して合計した総得点に基づいて、「飲み易さ」を評価することができる。

【0026】アミラーゼ処理工程におけるアミラーゼ処理の反応条件（例えば、アミラーゼ添加量、反応温度、反応pH、又は反応時間）は、原料米の種類、 α 化米の状態、あるいは、使用するアミラーゼの種類などに応じて、適宜決定することができる。例えば、精米米粒の加熱により得られた α 化米を、液化酵素6Tで処理する場合には、例えば、対米重量比0.1～1%の量でアミラーゼを添加し、60～70℃で1～3時間反応させることにより、アミラーゼ処理を実施することができる。 α 化米をアミラーゼ処理により液化させて得られる米デンプン加水分解液を用いて、次のプロテアーゼ処理工程を実施すると、プロテアーゼ処理効率が向上する。

【0027】プロテアーゼ処理工程で用いるプロテア-

ゼ（タンパク質分解酵素）は、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが生成可能なプロテアーゼである限り、特に限定されるものではないが、例えば、基質特異性の広いプロテアーゼ、例えば、中性プロテアーゼが好ましい。前記中性プロテアーゼとしては、例えば、プロテアーゼN【天野製薬（株）製】、プロテアーゼM【天野製薬（株）製】、サモアーゼ【大和化成（株）製】、プロチンP C 10 F【大和化成（株）製】、ヌクレイン【阪急バイオインダストリー（株）製】、フレーバーザイム【ノボノルディスクバイオインダストリー（株）製】、トリプシン【ノボノルディスクバイオインダストリー（株）製】、PTN【ノボノルディスクバイオインダストリー（株）製】、又はアルカラーゼ【ノボノルディスクバイオインダストリー（株）製】などを挙げることができる。

【0028】プロテアーゼNは、枯草菌(*Bacillus subtilis*)に由来する中性プロテアーゼであり、以下の理化学的性質を示す。作用pHについては、至適pHは7.0～7.5であり、特にpH6～8で有効に作用する。pH安定性については、25°Cで18時間の処理では、pH4.5～7.0（特に5.0～6.5）で安定である。作用温度については、至適温度は55°Cである。温度安定性については、基質存在下では、60°Cまでは安定に作用する（処理時間=15分間）。

【0029】プロテアーゼ処理工程で用いるプロテアーゼとしては、プロテアーゼNを用いることが特に好ましい。プロテアーゼNを用いると、他のプロテアーゼを用いた場合と比較して、よりACE阻害活性の高い米タンパク質加水分解液を得ることができ、しかも、前記米タンパク質加水分解液を飲料として摂取した場合に、口当たりが良くまろやかな喉越しを呈するという利点がある。

【0030】プロテアーゼ処理工程において、プロテアーゼによる加水分解処理の反応条件（例えば、プロテアーゼ添加量、反応温度、反応pH、又は反応時間）は、原料米の種類、米デンプン加水分解液の状態、あるいは、使用的プロテアーゼの種類などに応じて、適宜決定することができる。例えば、精米米粒の加熱により得られた α 化米を液化酵素6Tで処理して得られた米デンプン加水分解液を、プロテアーゼNで処理する場合には、例えば、対米重量比0.1～2%の量でプロテアーゼを添加し、50～60°Cで1～4時間反応させることにより、プロテアーゼ処理を実施することができる。プロテアーゼ処理工程では、プロテアーゼ処理を実施した後、所望により、プロテアーゼの失活処理を実施することが好ましい。前記失活処理としては、例えば、加熱処理を挙げることができ、例えば、プロテアーゼ処理を実施した後の液化米液を、90～100°Cで15～20分間の加熱処理を施すことにより、酵素を失活させること

ができる。

【0031】本発明の製造方法により得られる米タンパク質加水分解液は、それ自体、新規の米処理物であり、プロテアーゼによる米タンパク質の加水分解物である「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」を全て含有する。従って、米タンパク質加水分解液それ自体、あるいは、後述する限外濾過膜通過物又は画分B若しくは画分Cそれ自体も、本発明のACE阻害剤の有効成分として使用することができる。また、米タンパク質加水分解液、あるいは、限外濾過膜通過物又は画分B若しくは画分Cを、そのまま、非アルコール性米飲料として使用することもできるし、あるいは、食品添加剤又は飲料用添加剤として使用することもできる。

【0032】前記米タンパク質加水分解液から、「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」を得る場合には、ACE阻害活性を指標として、ポリペプチド又はペプチドの分画又は精製に一般的に用いられる方法、例えば、限外濾過、若しくは各種液体クロマトグラフィー【例えば、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、分配クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、又はアフィニティクロマトグラフィー等】、又はこれらの組合せを用いて、分画又は精製することにより、実施することができる。

【0033】各ペプチドのACE阻害活性は、例えば、川岸舜朗編、「食品中の生体機能調節物質研究法（生物化学実験法38）」、学会出版センター、1996年、第116頁に記載されている方法で測定することができる。すなわち、ACEを緩衝液に溶解して酵素溶液とし、Hip-His-Leu(Hippuryl-L-histidyl-L-leucine)を緩衝液に溶解して基質溶液とする。試料溶液と前記酵素溶液とを混合し、更に、前記基質溶液を加えて酵素反応させ、反応停止後に遊離してくる馬尿酸(Hippuric acid)をHPLCにより定量することにより、阻害率を算出することができる。

【0034】より具体的には、以下に述べる手順に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により、本発明の製造方法により得られる米タンパク質加水分解液から、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを分画及び精製することができる。すなわち、本発明の製造方法により得られる米タンパク質加水分解液を、分画分子量10,000の限外濾過膜を通過させる。得られた「分画分子量10,000の限外濾過膜通過物」を減圧濃縮した後、ゲル濾過カラム【例えば、セファデックスLH-20カラム（ファルマシア社製）】に負荷し、30%メタノール水溶液で溶出してACE阻害活性を有す

る画分を回収する。後述の実施例1に示すように、分子量400～1000の画分【実施例1における「画分B」（フラクションNo. 33、34、及び35）】に対応する。以下、画分Bと称する】と、分子量200～450の画分【実施例1における「画分C」（フラクションNo. 45及び46）】に対応する。以下、画分Cと称する】とに、顕著なACE阻害活性が認められる。

【0035】次いで、これらの画分（すなわち、画分B及び画分C）をイオン交換カラム【例えば、D E A E トヨパール650Mカラム（東ソー社製）】に負荷して、蒸留水で溶出した後、更に0～1moI/Lの塩化ナトリウム水溶液の直線濃度勾配により溶出される活性画分を回収する。実施例1に示すように、画分Bに由来する各画分については、蒸留水で溶出される画分【実施例1における「画分B13」】に対応する。以下、画分B13と称する】と、0.25moI/L塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分【実施例1における「画分B34」】に対応する。以下、画分B34と称する】とに、顕著なACE阻害活性が認められる。また、画分Cに由来する各画分については、0.4moI/L塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分【実施例1における「画分C36」】に対応する。以下、画分C36と称する】と、0.5moI/L塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分【実施例1における「画分C40」】に対応する。以下、画分C40と称する】とに、顕著なACE阻害活性が認められる。

【0036】更に、これらの画分（すなわち、画分B13、画分B34、画分C36、及び画分C40）を逆相カラム【例えば、μBondasphere 5μC18

300Åカラム（ウォーターズ社製）】を装填した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に供し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0～32%のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配により分画する。実施例1に示すように、画分B13に由来する各画分については、22%アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される画分【実施例1における「画分B13-9」】に対応する。以下、画分B13-9と称する】に、顕著なACE阻害活性が認められる。また、画分B34に由来する各画分については、18%アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される画分【実施例1における「画分B34-4」】に対応する。以下、画分B34-4と称する】に、顕著なACE阻害活性が認められる。また、画分C36に由来する各画分については、14%アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される画分【実施例1における「画分C36-4」】に対応する。以下、画分C36-4と称する】と、23%アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される画分【実施例1における「画分C36-10」】に対応する。以下、画分C36-10と称する】とに、顕著なACE阻害活性が認められる。更に、画分C40に由来す

る各画分については、25%アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される画分【実施例1における「画分C40-7」】に対応する。以下、画分C40-7と称する】に、顕著なACE阻害活性が認められる。【0037】統いて、画分B13-9についてのみ、高速液体クロマトグラフィー用陽イオン交換カラム【例えば、Shim-Pack PA-SPカラム（島津製作所製）】を装填したHPLCに供し、0～0.5moI/Lのリン酸緩衝液（pH 6.5）の直線濃度勾配により分画する。実施例1に示すように、得られた各画分の内、0.08moI/Lリン酸緩衝液で溶出される画分【実施例1における「画分B13-9-4」】に対応する。以下、画分B13-9-4と称する】と、0.1moI/Lリン酸緩衝液で溶出される画分【実施例1における「画分B13-9-5」】に対応する。以下、画分B13-9-5と称する】と0.2moI/Lリン酸緩衝液で溶出される画分【実施例1における「画分B13-9-6」】に対応する。以下、画分B13-9-6と称する】とに、顕著なACE阻害活性が認められる。

【0038】回収した活性画分を減圧乾固することにより、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを得ることができる。画分B34-4が、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；画分C36-4が、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるペプチドと、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるペプチドとの混合物であり；画分C36-10が、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；画分C40-7が、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；画分B13-9-4が、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；画分B13-9-5が、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；画分B13-9-6が、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである。

【0039】なお、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、米以外の他の生物のタンパク質であって、しかも、配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドと同一のアミノ酸配列を含むタンパク質を、プロテアーゼで加水分解することにより、製造することもできる。

【0040】本発明の製造方法により得られる米タンパク質加水分解液から、「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」を精製する前記過程で得られる各種中間精製物、すなわち、（1）前記「米タンパク質加水分解液」の限外濾過膜通過物（例えば、「分画分子量10,000の限外濾過膜通過物」又は「分画分子量1,000の限外濾過膜通過物」）；（2）画分B（すなわち、前記「米タンパク質加水分解液の限外濾過膜通過物」をゲル濾過カラムに負荷し、30%メタノール水溶液で溶出して得られる分子量400～1000の

画分) 又は画分C (すなわち、前記「米タンパク質加水分解液の限外濾過膜通過物」をゲル濾過カラムに負荷し、30%メタノール水溶液で溶出して得られる分子量200~450の画分) ; (3) 画分B13 (すなわち、前記「画分B」をイオン交換カラムに負荷し、蒸留水で溶出される画分) 、画分B34 (すなわち、前記「画分B」をイオン交換カラムに負荷し、0.25mol/L塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分) 、画分C36 (すなわち、前記「画分C」をイオン交換カラムに負荷し、0.4mol/L塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分) 、又は画分C40 (すなわち、前記「画分C」をイオン交換カラムに負荷し、0.5mol/L塩化ナトリウム水溶液で溶出される画分) ; あるいは、(4) 画分B13-9 (すなわち、前記「画分B13」を逆相カラムに負荷し、22%アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸で溶出される画分) は、それ自体、新規の物質である。また、これらの中間精製物は、「配列番号1~8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」の少なくとも1つを含有するので、これらの中間精製物をそのまま、あるいは、好ましくは適当な手段(例えば、減圧)により溶媒(例えば、メタノール、アセトニトリル、又はトリフルオロ酢酸など)を除去したものを、本発明のACE阻害剤の有効成分として使用することができる。

【0041】本発明のACE阻害剤は、配列番号1~8で表されるアミノ酸配列からなる8種類のペプチド又はその塩の内、いずれか1つを単独で、あるいは、2つ以上を組み合わせて、有効成分として含むことができ、所望により、薬剤学的に許容されることのできる担体又は希釈剤を更に含むことができる。また、本発明のACE阻害剤は、前記ペプチド又はその塩に代えて、あるいは、それに加えて、本発明の製造方法により得られる米タンパク質加水分解液、及び/又は前記中間精製物の少なくとも1つを、有効成分として含むことができる。前記担体又は希釈剤としては、例えば、固体担体、液体担体、又は乳化分散剤等を挙げることができ、より具体的には、例えば、水、ゼラチン、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、ラクトース、又は植物油等を挙げることができる。

【0042】本発明のACE阻害剤の剤型は、特に限定されるものではなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、粉剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。

【0043】これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスター、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タル

ク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、又は酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。

【0044】非経口投与方法としては、注射(皮下、静脈内等)、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。例えば、注射剤の調製においては、有効成分の他に、例えば、生理食塩水若しくはリンゲル液等の水溶性溶剤、植物油若しくは脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖若しくは塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、又は乳化剤などを任意に用いることができる。

【0045】また、本発明のACE阻害剤は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明のACE阻害剤をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療又は予防すべき組織中に外科的に移植することができる。

【0046】また、投与形態も医薬品に限定されるものではなく、種々の形態、例えば、機能性食品、特定保健用食品、若しくは健康食品(飲料を含む)、又は飼料として飲食物の形で与えることも可能である。前記食品としては、例えば、清涼飲料、乳酸飲料、調味料、スープ、チーズ、ハム、又は菓子類などを挙げることができる。

【0047】本発明のACE阻害剤を用いる場合の投与量は、特に限定されるものではなく、例えば、病気の種類、患者の年齢、性別、体重、症状の程度、又は投与方法などに応じて適宜決定することができる。例えば、境界領域の高血圧症感覚への経口投与の場合には、ペプチド量(2種類以上のペプチドを組み合わせて用いる場合には、その合計量)として、1日当たり1mg/kg~20mg/kgであることが好ましく、4mg/kg~10mg/kgであることがより好ましい。

【0048】本発明のACE阻害剤中に有効成分として含まれる、配列番号1~8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩の含有量は、例えば、その投与経路又は剤形によって適宜変更することができるが、例えば、製剤全重量に対して前記ペプチド又はその塩を5~90重量%、好ましくは10~60重量%含有することができる。また、機能性食品又は特定保健用食品に添加して用いる場合には、例えば、前記食品中における前記ペプチド又はその塩を0.01~50重量%含有させることができる。配列番号1~8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド又はその塩は、精製したペプチド単体として用いることもできるし、あるいは、ペプチド混合物として用いることもできる。また、血圧降下作用の

ある医薬のほか、ACEを阻害する機能のある特定保健用食品又は機能性食品などとして用いることもできる。

【0049】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】《ACE阻害ペプチドの精製》精米した米粒5kgに、水10Lを加え、99°Cで20分間加熱することにより、α化米飯14kgを調製した。次いで、このα化米飯にアミラーゼ〔液化酵素6T；阪急バイオインダストリー(株)製〕10g(対米重量比0.2%)を添加し、60°Cで2時間反応させることにより、α化米飯の液化を行ない、米デンプン加水分解液を得た。得られた米デンプン加水分解液に、プロテアーゼ〔プロテアーゼN；天野製薬(株)製〕5g(対米重量比0.1%)を添加し、50°Cで2時間反応させた後、酵素を失活させるために、100°Cで15分間の加熱処理を施し、米タンパク質加水分解液14kgを得た。

【0050】得られた米タンパク質加水分解液の内、その一部分100mLを、分画分子量10,000の限外濾過膜YM-10(アミコン社製)に付して、通過する低分子量の物質を回収し、次いで、分画分子量1,000の限外濾過膜YM-1(アミコン社製)に付して、通過する更に低分子量の物質を回収した。これを容量20mLに減圧濃縮し、得られた濃縮液10mLをセファデックスLH-20カラム(26×900mm；ファルマシア社製)に負荷し、30%メタノール水溶液で溶出した。7.5mL/フラクションで分画し、ACE阻害活性を有する「画分B」(フラクションNo.33, 34, 及び35)及び「画分C」(フラクションNo.45及び46)を回収した。なお、本実施例では、ACE阻害活性の測定を、後述の評価例1に記載の測定法により実施した。残りの濃縮液10mLについても、同様に分画し、画分B及び画分Cを回収した。

【0051】次いで、前記画分BをDEAEトヨパール650Mカラム(16×650mm；東ソー社製)に負荷し、蒸留水で溶出される活性画分「B13」を回収した。更に、0~1mol/Lの塩化ナトリウム水溶液の直線濃度勾配により溶出を行ない、0.25mol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出される活性画分「B34」を回収した。また、画分CをDEAEトヨパール650Mカラムに負荷し、0~1mol/Lの塩化ナトリウム水溶液の直線濃度勾配により溶出を行ない、0.4mol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出される活性画分「C36」と、0.5mol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出される活性画分「C40」とを回収した。

【0052】前記各活性画分B13、B34、C36、及びC40を、それぞれ、μBondapakphere5μC18 300Åカラム(3.9×150mm；ウォーターズ社製)を用いたHPLCで、0.1%トリフル

オロ酢酸を含む0~32%のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配溶出(流速1mL/min, 0~32%の勾配を18分間で行なう)により分画した。活性画分B13を分画することにより、13.0分間の保持時間に溶出される活性画分「B13-9」を得た。活性画分B34を分画することにより、10.5分間の保持時間に溶出される活性画分「B34-4」を得た。活性画分C36を分画することにより、8.2分間及び13.8分間の保持時間に溶出される活性画分「C36-4」及び「C36-10」を得た。そして、活性画分C40を分画することにより、14.7分間の保持時間に溶出される活性画分「C40-7」を得た。活性画分B13-9は、Shim-Pack PA-SPカラム(8×100mm；島津製作所製)を用いたHPLCで、0~0.5mol/Lのリン酸緩衝液(pH6.5)の直線濃度勾配溶出により分画し、活性画分「B13-9-4」、「B13-9-5」、及び「B13-9-6」を得た。

【0053】このようにして精製した8種の各ペプチドの構造は、プロテインシーケンサー491型(アプライドバイオシステムズ社)により解析したところ、活性画分B34-4のペプチドは、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；活性画分C36-4は、配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるペプチドと、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるペプチドとの混合物であり；活性画分C36-10は、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；活性画分C40-7は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；活性画分B13-9-4は、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；活性画分B13-9-5は、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであり；活性画分B13-9-6は、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであることが判明した。

【0054】次に、これら8種のペプチドと同一の配列を有する化学合成ペプチドを合成し、これらの化学合成ペプチドのHPLCピークの保持時間を、米タンパク質加水分解液から得られたペプチドの保持時間と比較した。なお、HPLCは、カラムとして、μBondapakphere5μC18 300Åカラム(3.9×150mm；ウォーターズ社製)を使用し、溶出液として、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0~32%のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配(18分間)を使用し、流速1mL/minの条件で、210nmの紫外外部吸収を検出することにより、実施した。その結果、化学合成したそれぞれのペプチドの保持時間は、精製したそれぞれのペプチドの保持時間と一致した。

【0055】

【評価例1】《ACE阻害活性の測定》実施例1におけるACE阻害活性の測定は、下記の方法により行なった。すなわち、ウサギ肺由来ACE(シグマ社)を、2

2 mmol/Lホウ酸緩衝液(pH 8.3)に溶解し、60mU/mLの酵素溶液とした。また、Hip-His-Leu (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine; 株式会社ペプチド研究所) 及び塩化ナトリウムを、前記ホウ酸緩衝液に溶解し、それぞれの濃度が7.6 mmol/L及び6.08 mmol/L(反応液中の終濃度は、それぞれ、5 mmol/L及び4.00 mmol/Lになる)である基質溶液を調製した。0.5 mL容量のプラスチックチューブに、試料溶液15 μLと前記酵素溶液50 μLとを入れ、37°Cで5分間保温した後、前記基質溶液125 μLを加えてよく混合し、37°Cで30分間の反応を行なった。その後、10%トリフルオロ酢酸20 μLを添加することにより、反応を停止させた。反応停止後、酵素反応により

$$\text{阻害率 (\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (1)$$

[式中、Aは、コントロールにおける馬尿酸のピーク面積であり、Bは、試料溶液添加の場合の馬尿酸のピーク面積である]により算出した。また、前記阻害率が50%になるペプチド濃度をIC50値で表した。

【0057】セファデックスLH-20カラムによる分画のクロマトグラムを、各分画におけるACE阻害率と併せて、図1に示す。同様に、画分BのDEAEトヨパール650Mカラムによる分画のクロマトグラム及び各分画におけるACE阻害率を、図2に示し、画分CのDEAEトヨパール650Mカラムによる分画のクロマトグラム及び各分画におけるACE阻害率を、図3に示す。図1～図3において、曲線aは、280nmにおける吸光度を示し、菱形及びそれを結ぶ折れ線bは、ACE阻害率を示す。また、図2及び図3における点線cは、溶出に用いた塩化ナトリウム水溶液の濃度を示す。

《表1》

ペプチドの種類 (配列番号)	IC50値 (μmol/L)	画分	アミノ酸配列
1	11	C40-7	WAP
2	24	C36-10	WQP
3	160	B13-9-5	IFR
4	170	C36-4	TY
5	230	B13-9-6	GYPRTPRT
6	340	C36-4	QY
7	520	B34-4	FDR
8	550	B13-9-4	AFTP

【0060】

《表2》

試料	IC50値 (mg/mL)
米タンパク質加水分解液	3.4
分画分子量10,000の限外濾過膜通過物	1.9
分画分子量1,000の限外濾過膜通過物	1.4

【0061】

【発明の効果】本発明のACE阻害剤は、高血圧治療や

遊離した馬尿酸をHPLCにより定量した。なお、HPLCは、カラムとして、μBondasphere 5 μC18 300Åカラム(3.9×150mm; ウォーターズ社製)を使用し、溶出液として、0.1%トリフルオロ酢酸を含む0～6.3%のアセトニトリル水溶液の直線濃度勾配(20分間)を使用し、流速1mL/minの条件で、228nmの紫外外部吸収を検出することにより、実施した。なお、コントロールとして、試料溶液15 μL、酵素溶液50 μL、及び基質溶液125 μLを混合する代わりに、水15 μL、酵素溶液50 μL、及び基質溶液125 μLを混合したこと以外は、前記操作を繰り返した。

【0056】ACEの阻害率は、式(1)：

$$\text{阻害率 (\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (1)$$

更に、図1に示す各記号A、B、及びCは、それぞれ、画分A、画分B、及び画分Cを意味する。同様に、図2に示す各記号B13及びB34は、それぞれ、画分B13及び画分B34を意味し、図3に示す各記号C36及びC40は、それぞれ、画分C36及び画分C40を意味する。

【0058】各ペプチドについて得られたIC50値を表1に示す。また、アミノ酸配列を一文字表記で示す。また、米タンパク質加水分解液、分画分子量10,000の限外濾過膜通過物、並びに分画分子量1,000の限外濾過膜通過物について得られたIC50値を表2に示す。なお、表2に示すIC50値は、乾燥重量に基づくものであって、タンパク質以外に相当量の糖類が含まれる。

【0059】

予防のための医薬品、あるいは、特定保健用食品の素材として利用することができる。本発明のACE阻害剤の

有効成分として用いることのできる、本発明の「配列番号1～8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド」の内、配列番号1、2、5、又は8で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、プロリンを含むため、消化管内及び血管内での安定性が高い。プロリンの周辺はプロテアーゼによる加水分解を受けにくいためである。また、配列番号1～4、6、又は7で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、2残基又は3残基のアミノ酸からな

るため、血管内への吸収性が高い。また、本発明のACE阻害剤の有効成分として用いることのできる、本発明の米タンパク質加水分解液は、ACE阻害活性を有するだけでなく、飲み易さの点で非常に優れた米飲料である。

【0062】

【配列表】

<:110>; National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<:110>; Okinawa Food Co., Ltd.

<:120>; Agent for inhibiting angiotensin I converting enzyme

<:130>; OKI010001P

<:160>; 10

<:210>; 1

<:211>; 3

<:212>; PRT

<:213>; Oryza sp.

<:400>; 1

Trp Ala Pro

1

<:210>; 2

<:211>; 3

<:212>; PRT

<:213>; Oryza sp.

<:400>; 2

Trp Gln Pro

1

<:210>; 3

<:211>; 3

<:212>; PRT

<:213>; Oryza sp.

<:400>; 3

Ile Phe Arg

1

<:210>; 4

<:211>; 2

<:212>; PRT

<:213>; Oryza sp.

<:400>; 4

Thr Tyr

1

<:210>; 5

<:211>; 8

<:212>; PRT

<:213>; Oryza sp.

<:400>; 5

Gly Tyr Pro Arg Thr Pro Arg Thr

```

<:210>; 6
<:211>; 2
<:212>; PRT
<:213>; Oryza sp.
<:400>; 6
Gln Tyr
    1
<:210>; 7
<:211>; 3
<:212>; PRT
<:213>; Oryza sp.
<:400>; 7
Phe Asp Arg
    1
<:210>; 8
<:211>; 5
<:212>; PRT
<:213>; Oryza sp.
<:400>; 8
Ala Phe Thr Pro Arg
    1          5
<:210>; 9
<:211>; 10
<:212>; PRT
<:213>; Homo sapiens
<:400>; 9
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
    1          5          10
<:210>; 10
<:211>; 8
<:212>; PRT
<:213>; Homo sapiens
<:400>; 10
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
    1          5

```

【図面の簡単な説明】

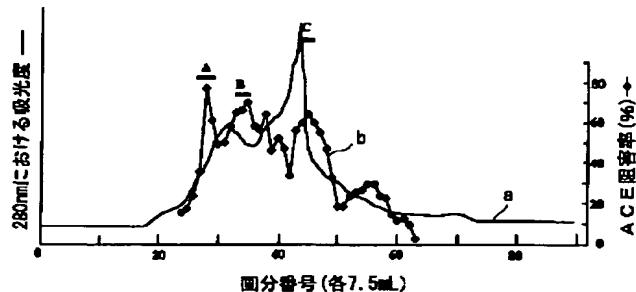
【図1】セファデックスLH-20カラムによる分画の結果を示すクロマトグラムである。

【図2】画分BのDEAEトヨパール650Mカラムに

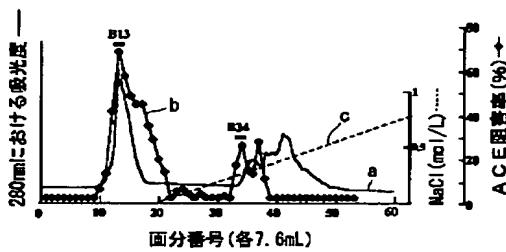
よる分画の結果を示すクロマトグラムである。

【図3】画分CのDEAEトヨパール650Mカラムによる分画の結果を示すクロマトグラムである。

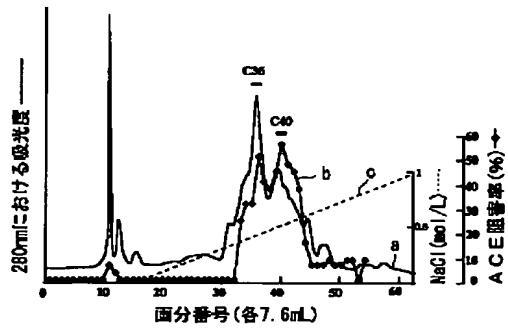
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 P 43/00	1 1 1	C O 7 K 5/083	
	1 1 6	5/087	
C O 7 K 5/083		5/097	
5/087		7/14	
5/097		C 1 2 N 9/99	
7/14		C 1 2 P 21/06	
C 1 2 N 9/99		A 6 1 K 37/64	
C 1 2 P 21/06		37/18	

(72)発明者 遠矢 亮一

沖縄県浦添市勢理客4丁目4番1号 沖縄
食糧株式会社内

Fターム (参考) 4B018 MD20 MD50 ME04 MF01 MF12
 4B064 AG21 CA21 CD22 CE06 CE07
 DA01 DA10
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA14
 BA15 BA16 BA23 BA44 CA14
 DC40 DC50 NA14 ZC022
 ZC172 ZC202
 4H045 AA30 BA11 BA12 BA13 BA15
 CA31 DA57 EA01 EA23 GA10
 GA22 HA02